

MANUAL TÉCNICO

Maxwell® CSC Blood DNA Kit

Instruções de utilização do produto
AS1321

Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

Maxwell® CSC Blood DNA Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: www.promega.com/protocols/
Visite o Website para verificar se está a utilizar a versão mais atual deste Manual técnico.
Se tiver quaisquer dúvidas sobre a utilização deste sistema, envie um e-mail para o nosso centro de assistência,
Promega Technical Services: techserv@promega.com

1. Descrição	2
2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos.....	3
3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto	5
4. Limitações de utilização do produto.....	5
5. Antes de começar	6
5.A. Preparação de amostras de sangue total.....	6
5.B. Preparação dos Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges	7
6. Execução do instrumento.....	9
7. Pós-purificação	11
8. Avaliação do desempenho analítico.....	12
8.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de DNA	12
8.B. Reprodutibilidade	15
8.C. Substâncias interferentes (Inibição).....	17
8.D. Contaminação cruzada	17
9. Avaliação do desempenho clínico.....	18
9.A. Amplificabilidade do DNA	18
9.B. Reprodutibilidade	19
9.C. Contaminação cruzada	19
10. Resolução de Problemas	20
11. Bibliografia.....	21
12. Produtos Relacionados	21
13. Resumo das alterações.....	22

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit está disponível apenas em alguns países.

1. Descrição

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit^(a,b) é utilizado, em conjunto com o Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1, de modo a proporcionar um método fácil para a purificação automática e eficiente de DNA genômico (gDNA) a partir de amostras de sangue humano. O Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e reagentes adicionais fornecidos com o kit com métodos de purificação pré-programados, proporcionando uma maior simplicidade e comodidade. Os Maxwell® CSC Instruments permitem processar de uma até ao máximo de amostras permitido em aproximadamente 40 minutos e o DNA purificado pode ser utilizado diretamente em diversas aplicações a jusante, como PCR.

Tabela 1. Instrumentos suportados.

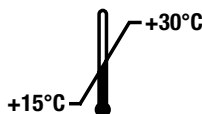
Instrumento	Cat. #	Manual técnico
Maxwell® CSC	AS6000	TM457
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623

Princípio do Método: o Maxwell® CSC Blood DNA Kit purifica o ácido nucleico, utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel que otimizam a captura, a lavagem e a purificação de amostras de gDNA. O Maxwell® CSC Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas que ligam eficiente de gDNA às partículas paramagnéticas no primeiro poço de um cartucho pré-cheio e move a amostra ao longo dos poços do cartucho. Esta abordagem à captura magnética evita problemas comuns, como pontas entupidas ou transferências de reagentes parciais, que resultam no processamento subótimo da purificação por outros sistemas automáticos normalmente utilizados.

2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC Blood DNA Kit	48 preparações	AS1321

Para utilização em diagnóstico in vitro. Apenas para utilização profissional. Quantidade suficiente para 48 isolamentos automáticos a partir de 300 µl de amostras de sangue total. Os Maxwell® CSC Cartridges destinam-se apenas a uma única utilização.



Inclui:

- 2 × 1 ml Solução de proteinase K (PK)
- 20 ml Tampão de lise
- 48 Maxwell® CSC Blood Cartridges
- 50 Êmbolos CSC/RSC
- 50 Tubos de eluição (0,5 ml)
- 20 ml Tampão de eluição

Condições de armazenamento: armazene o Maxwell® CSC Blood DNA Kit entre +15 a +30 °C.



Informações de segurança: os cartuchos contêm etanol e isopropanol. Estas substâncias devem ser consideradas como inflamáveis, nocivas e irritantes. Tampão de lise contém cloridrato de guanidina e ureia. Estas substâncias devem ser consideradas como tóxicas, nocivas e irritantes. Consulte o SDS para informações detalhadas sobre segurança.



Os componentes do Maxwell® CSC Blood DNA Kit são concebidos para serem utilizados com substâncias potencialmente infecciosas. Use equipamento de proteção individual adequado (por exemplo, luvas e óculos de proteção) durante o manuseamento de substâncias infecciosas. Cumpra as diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias infecciosas quando utilizadas com este sistema.

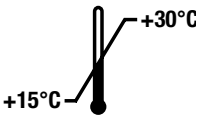


Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

Informações adicionais: os componentes do Maxwell® CSC Blood DNA Kit são qualificados e testados de acordo com o controlo de qualidade para trabalharem em conjunto. Não é recomendado misturar componentes de kits com lotes de kits diferentes. Utilize apenas os componentes fornecidos no kit. Não utilize os cartuchos se o selo no cartucho não estiver intacto no momento da receção.

2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos (continuação)

Legenda dos símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Conservar a +15 a +30 °C.		Fabricante
	Atenção		Irritante
	Risco de saúde.		Conteúdo suficiente para "n" testes.
	Conformidade Europeia		Aviso. Riscos biológicos.
	Aviso. Perigo de entalamento.		Número de catálogo
	Número de lote		Não reutilizar.

3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com o Maxwell® CSC Instruments e com o método de purificação Maxwell® CSC Blood DNA, como um dispositivo médico (IVD) para diagnóstico in vitro para a realização do isolamento automático de DNA genômico a partir de amostras de total sangue humano. O DNA purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação.

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit destina-se a ser utilizado a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. A utilização fora deste intervalo de temperatura pode dar origem a resultados subótimos.

As amostras de sangue total recolhidas em tubos para recolha de sangue que contêm anticoagulantes de citrato de sódio, de heparina ou de EDTA podem ser utilizadas com o Maxwell® CSC Blood DNA Kit. A tabela apresenta o tempo aceitável para o armazenamento de amostras sob diferentes condições antes da respetiva utilização no Maxwell® CSC Blood DNA Kit. O Maxwell® CSC Blood DNA Kit não se destina a ser utilizado com amostras que tenham sido recolhidas noutros tipos de tubos para recolha de sangue ou armazenadas de outra forma que não de acordo com as condições listadas abaixo.

Temperatura de armazenamento da amostra	Tempo de armazenamento antes da purificação
15–30 °C	Até 72 horas
2–10 °C	Até 7 dias
–80 °C ou inferior	Indefinidamente

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit destina-se exclusivamente a utilização profissional. Os resultados do diagnóstico obtidos através da utilização de DNA genômico purificado com este sistema devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos ou laboratoriais.

4. Limitações de utilização do produto

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit não se destina a ser utilizado com amostras de tecido ou com amostras de fluidos corporais diferentes de sangue total humano ou com amostras de sangue total humano coagulado.

O Maxwell® CSC Blood DNA Kit não se destina a ser utilizado com amostras não humanas, incluindo amostras virais ou bacterianas, ou para a purificação de RNA.

O desempenho do Maxwell® CSC Blood DNA Kit foi avaliado através do isolamento de DNA a partir de 50–300 µl de amostras de sangue total com uma contagem de glóbulos brancos (WBC) de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml.

O desempenho do Maxwell® CSC Blood DNA Kit foi avaliado quanto à compatibilidade com os seguintes fatores potenciais de inibição de amplificação de DNA genômico: hemo, álcool, IgG e guanidina. Ainda não foram avaliados outros compostos.

O utilizador é responsável pelo estabelecimento das características de desempenho necessárias às aplicações de diagnóstico a jusante. Devem ser incluídos controlos adequados em todas as aplicações de diagnóstico a jusante que utilizem DNA genômico purificado com o Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

5. Antes de começar

Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- agitador vórtex de bancada
- pipetadores e pontas de pipeta para transferência de amostras para cartuchos de reagentes pré-cheios
- tubos de 1,5–2,0 ml para a incubação de amostras (por exemplo, microtubos, 1,5 ml [Cat.# V1231])
- bloco de aquecimento definido para 56 °C
- **opcional:** agitador de tubos rotativo para amostras de sangue líquido

5.A. Preparação de amostras de sangue total

Capacidade de processamento de amostras de sangue total

A colheita de DNA genómico total a partir de amostras de sangue total depende do volume da amostra e do número de glóbulos brancos/ml. Cada um dos cartuchos fornecidos com o Maxwell® CSC Blood DNA Kit é concebido para purificar DNA genómico a partir de 50–300 µl de sangue total, com uma contagem de glóbulos brancos de 4×10^6 a 10×10^6 WBC/ml de sangue total (valores para um adulto normal saudável; 1). Recomendamos a realização de uma contagem de glóbulos brancos em cada amostra antes da purificação do DNA para se certificar de que a amostra está dentro deste intervalo. As amostras fora deste intervalo podem não fornecer resultados ótimos.

Nota: este kit foi testado com amostras de sangue total humano recolhidas em tubos de EDTA, de citrato de sódio ou de heparina. O desempenho da técnica não pode ser assegurado com outros tipos de tubos para recolha de sangue. As amostras de sangue podem ser frescas (armazenadas entre 15–30 °C até ao máximo de 72 horas), refrigeradas (armazenadas entre 2–10 °C até ao máximo de sete dias) ou congeladas (armazenadas a –80 °C ou inferior) antes da purificação de DNA. As amostras congeladas devem ser descongeladas antes do processamento. Todas as amostras de sangue devem ser muito bem misturadas antes da utilização.

1. Misture todas as amostras de sangue durante, pelo menos, 5 minutos entre 15–30 °C.
2. Prepare e etiquete os tubos de incubação que irão encaixar no bloco de aquecimento definido para 56 °C.
3. Adicione 30 µl de solução de proteinase K (PK) a cada tubo de incubação.
4. Adicione sangue líquido (entre 50 µl e 300 µl) a cada tubo de incubação. Tenha extremo cuidado para evitar material coagulado (caso exista) durante a transferência do sangue para o tubo de incubação. O sistema não se destina a ser utilizado com amostras de sangue coagulado. Mude as pontas entre cada transferência da amostra de sangue para evitar a contaminação cruzada.
5. Adicione 300 µl de tampão de lise a cada tubo de incubação. Mude as pontas entre cada transferência de tampão de lise para evitar a contaminação cruzada.
6. Agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
7. Incube cada um dos tubos no bloco de aquecimento (definido para 56 °C) durante 20 minutos. Durante esta incubação, prepare os cartuchos conforme descrito na Secção 5.B.

8. Inspeção cada um dos lisatos após a incubação. A seguir ao tratamento de proteinase K, a amostra muda de cor, passa de vermelha para castanho esverdeado. Caso as amostras não mudem de cor após o tratamento de proteinase K, tal indica que o tratamento foi ineficaz e a pureza e a colheita de DNA pós-purificação serão afetadas. Não processe mais as amostras se não observar qualquer alteração de cor no final do período de incubação de proteinase K.
9. Transfira cada uma das amostras de lisato de sangue do tubo de incubação para o poço n.º 1 de um cartucho separado (poço n.º 1 é o maior poço no cartucho). Mude as pontas entre cada transferência de sangue para evitar a contaminação cruzada da amostra.

5.B. Preparação dos Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges

1. Troque de luvas antes de manusear os cartuchos, os êmbolos CSC/RSC e os tubos de eluição. Os cartuchos estão instalados nos tabuleiros da plataforma fora do instrumento e o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos e as amostras são, de seguida, transferidos para o instrumento para purificação. Coloque cada um dos cartuchos no tabuleiro da plataforma com o poço n.º 1 (o poço maior do cartucho) o mais afastado possível dos tubos de eluição (Figura 2). Pressione para baixo o cartucho de forma a encaixá-lo na respetiva posição. Certifique-se de que ambas as extremidades do cartucho estão totalmente encaixadas no tabuleiro da plataforma. Remova cuidadosamente o selo de forma a retirar a totalidade do selo da parte superior do cartucho. Certifique-se de que remove a totalidade da película aderente vedante e eventuais resíduos de adesivo do cartucho.



Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado. As extremidades do selo podem ser cortantes.

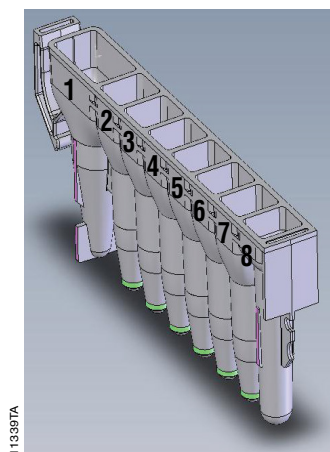
2. Coloque um êmbolo no poço n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque um tubo de eluição vazio na posição do tubo de eluição para cada cartucho nos tabuleiros da plataforma.
Nota: utilize apenas os tubos de eluição fornecidos no Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Outros tubos de eluição podem não ser compatíveis com o Maxwell® CSC Instruments e podem afetar o desempenho de purificação de DNA.
4. Adicione 50–100 µl de tampão de eluição ao fundo de cada tubo de eluição.
Nota: utilize apenas o tampão de eluição fornecido no Maxwell® CSC Blood DNA Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar o desempenho da purificação de DNA.

Notas de preparação dos Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges



Os pingos de reagente ou de amostra retidos em qualquer parte do tabuleiro da plataforma deverão ser limpos com uma solução de água e detergente, seguido de um spray ou toalhete bactericida e em seguida, água. Não utilize lixívia em nenhum componente do instrumento.

5.B. Preparação dos Maxwell® CSC Blood DNA Cartridges (continuação)



Adições do utilizador ao conteúdo do poço:

1. Amostra de sangue total lisada
8. Êmbolo CSC/RSC

Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge. A amostra de sangue total lisada é adicionada ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.



Figura 2. Instalação e configuração do tabuleiro de plataforma. O tampão de eluição é adicionado aos tubos de eluição, conforme indicado.

6. Execução do instrumento

Para informações detalhadas, consulte o Manual Técnico específico do seu Maxwell® CSC Instrument. Consulte a Tabela 1.

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Acesse ao Tablet PC e inicie o software Maxwell® IVD-mode tocando duas vezes no ícone no ambiente de trabalho. O instrumento executa uma autoverificação e coloca todas as peças móveis na respetiva posição inicial.
2. Selecione **Iniciar** no ecrã Página Inicial.
3. Digitalize ou introduza o código de barras do canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC Blood DNA Kit e pressione **OK** para selecionar automaticamente o método a executar (Figura 3).

Nota: o código de barras do método do Maxwell® CSC Blood DNA Kit é necessário para a purificação de DNA no Maxwell® CSC Instruments. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 3. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, caso o código de barras não possa ser digitalizado.



Figura 3. Etiqueta do kit que indica o código de barras a digitalizar. Digitalize o código de barras, exibido na caixa vermelha, no canto superior direito da etiqueta do kit, para começar a executar a purificação.

4. No ecrã de "Configuração do cartucho", toque nas posições do cartucho para selecionar ou anular a seleção de qualquer posição a utilizar para a execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e pressione o botão **Prosseguir** para continuar.

Nota: quando estiver a usar o Maxwell® CSC 48 Instrument, pressione o botão **Anterior** ou **Posterior** para marcar ou desmarcar as posições dos cartuchos em cada tabuleiro de plataforma.

6. Execução do instrumento (continuação)

5. Após abrir a porta, confirme que todos os itens da lista de verificação de extração foram realizados. Verifique se as amostras pré-processadas foram adicionadas ao poço n.º 1 dos cartuchos, se os cartuchos estão carregados no instrumento, se os tubos de eluição destapados estão presentes com tampão de eluição e se os êmbolos estão colocados no poço n.º 8. Transfira o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® instrument.

Inserir o tabuleiro da plataforma Maxwell®: segure o tabuleiro da plataforma de ambos os lados para evitar que os cartuchos saiam dos respectivos encaixes no tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que o tabuleiro da plataforma é colocado no Maxwell® Instrument com os tubos de eluição próximos da porta. Posicione o ângulo da parte posterior do tabuleiro da plataforma para baixo e coloque no instrumento de maneira a que a parte posterior do tabuleiro da plataforma fique apoiada na parte posterior da plataforma do instrumento. Pressione a parte dianteira do tabuleiro da plataforma para baixo para assentar o tabuleiro da plataforma na plataforma de instrumentos. Se tiver dificuldade em encaixar o tabuleiro da plataforma na plataforma, verifique se o tabuleiro da plataforma está na orientação correta. Assegure-se de que o tabuleiro da plataforma se encontra nivelado com a plataforma de instrumentos e totalmente assente.

Nota: verifique o identificador nas bandejas de convés Maxwell® de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

6. Toque no botão **Iniciar** para iniciar o ciclo de purificação. A plataforma vai retrain e a porta vai fechar.

Nota: ao utilizar o Maxwell® Instrument de 48 posições, se o Sistema de Visão tiver sido ativado, os tabuleiros da plataforma serão digitalizados à medida que a porta se retrai. Quaisquer erros na configuração do tabuleiro de plataforma (por exemplo, êmbolos não presentes no poço n.º 8, tubos de eluição não presentes e abertos) irão causar o software regressar ao ecrã "Configuração do cartucho" e as posições problemáticas serão marcadas com um ponto de exclamação num círculo vermelho. Toque no ponto de exclamação para obter uma descrição do erro e resolver todos os estados de erro. Toque no botão **Iniciar** novamente para repetir a digitalização do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.



Aviso: perigo de entalamento.

7. O Maxwell® Instrument irá iniciar imediatamente a execução de purificação. O ecrã irá apresentar os passos realizados e o tempo aproximado restante na execução.

Notas:

1. Tocar no botão **Abortar** irá abandonar a execução. Todas as amostras de uma execução abortada serão perdidas.
 2. Se a execução for abandonada antes da conclusão, poderá ser-lhe pedido para verificar se os êmbolos ainda estão carregados na barra do êmbolo. Se os êmbolos estão presentes na barra do êmbolo, deve desempenhar uma **Limpeza** quando pedido. Se os êmbolos não estão presentes na barra do êmbolo, pode escolher ignorar a **Limpeza** quando pedido. As amostras serão perdidas.
8. Uma vez concluída a execução, a interface do utilizador irá apresentar uma mensagem que o método terminou.

Fim da execução

9. Siga as instruções apresentadas no ecrã no final do método para abrir a porta. Verifique se os êmbolos se encontram no poço n.º 8 do cartucho, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual de Operação adequadas para o seu Maxwell® Instrument (ver Tabela 1) para desempenhar um processo de **Limpeza** para tentar descarregar os êmbolos.
10. Remova os tabuleiros da plataforma do instrumento imediatamente a seguir à execução para evitar a evaporação dos eluatos. Remova os tubos de eluição que contêm DNA e feche os tubos.

Nota: a seguir a um procedimento de execução automática, o tabuleiro da plataforma pode estar quente. Para remover o tabuleiro da plataforma do instrumento, segure em ambos os lados do tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que as amostras foram removidas do instrumento antes de executar o protocolo de desinfecção UV, para evitar danificar o ácido nucleico purificado.



11. Remova os cartuchos e os êmbolos do tabuleiro de plataforma Maxwell®. Elimine os resíduos perigosos de acordo com os procedimentos da sua instituição. Não reutilize os Maxwell® CSC Cartridges, os êmbolos CSC/RSC ou os tubos de eluição.

7. Pós-purificação

Determine se a pureza e a concentração da amostra de DNA purificado correspondem aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante adequado antes da utilização nesse ensaio.

8. Avaliação do desempenho analítico

A avaliação do desempenho analítico do Maxwell® CSC Blood DNA Kit foi realizada utilizando amostras de sangue total num Maxwell® CSC Instrument. O desempenho equivalente do Maxwell® CSC Blood DNA Kit com o Maxwell® CSC 48 Instrument foi demonstrado como parte do desenvolvimento desse instrumento.

8.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de DNA

Tabela 2. Colheita de DNA e Pureza de amostras de soro obtidas de sangue total com contagens de glóbulos brancos (WBC) diferentes. A extração do DNA de oito replicados de amostras para cada condição listada para avaliar a quantidade, qualidade e amplificabilidade de DNA. O DNA foi extraído de 300 µl de sangue total com contagens de glóbulos brancos (WBC) que variaram entre 4×10^6 – 10×10^6 WBC/ml e eluído em 50 µl. A absorvância de DNA purificado foi medida a 230 nm, 260 nm, 280 nm e 340 nm. A concentração de DNA foi determinada utilizando a absorvância a 260 nm depois de subtrair a absorvância do controlo em branco e corrigindo o ruído do instrumento (absorvância a 340 nm). Todos os cálculos da absorvância descritas nesta avaliação do desempenho foram realizadas desta maneira. A concentração de DNA foi multiplicada pelo volume de DNA eluído para determinar a colheita, e os rácios de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram calculados para avaliar a qualidade do DNA. O Maxwell® CSC Blood DNA Kit originou uma colheita de quantidades aceitáveis de DNA ($\geq 3,00$ pg/WBC) para todas as amostras de sangue total testadas, independentemente da contagem de glóbulos brancos. As colheitas médias de DNA purificado foram de $\geq 4,18$ pg/WBC, com rácios de $A_{260}/A_{280} \geq 1,89$ e rácios de $A_{260}/A_{230} \geq 1,68$.

Doador	Colheita total de DNA média (µg) (n = 8)	Contagem de glóbulos brancos (WBC/ml)	Colheita de DNA média por glóbulos brancos (pg)	Rácio de	
				A_{260}/A_{280} médio	A_{260}/A_{230} médio
1	6,0	$4,5 \times 10^6$	4,45	1,90	1,68
2	8,6	$6,9 \times 10^6$	4,18	1,89	1,91
3	12,4	$9,4 \times 10^6$	4,45	1,91	2,01

Tabela 3. Colheita de DNA e Pureza de sangue total recolhido com diferentes anticoagulantes.

A quantidade e a qualidade foram avaliadas para eluatos de DNA purificado preparado a partir de sangue total recolhido em tubos para recolha de sangue normalmente utilizados contendo EDTA, citrato de sódio ou heparina como o anticoagulante. As amostras de sangue foram refrigeradas ou congeladas e equilibradas à temperatura ambiente antes da extração do DNA. O DNA foi purificado de oito replicados de 300 µl para cada anticoagulante e eluído em 50 µl. A concentração de DNA, a colheita de DNA e rácios de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram calculados e são apresentados na tabela abaixo. Colheitas consistentes e rácios de pureza foram observados no DNA extraído de todas as amostras utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit.

Tipo de tubo para recolha de sangue	Colheita total de DNA média (µg) (n = 8)	Concentração de DNA média (ng/µl)	Rácio de A_{260}/A_{280} médio	Rácio de A_{260}/A_{230} médio
EDTA	10,97	281,28	1,91	1,94
Citrato de sódio	11,29	283,57	1,93	2,02
Heparina	11,99	307,48	1,94	2,08

8.A. Quantidade, qualidade e amplificabilidade de DNA (continuação)

Tabela 4. Amplificabilidade do DNA extraído do sangue total. A amplificabilidade foi avaliada por qPCR do DNA extraído do sangue total utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Cada amostra de DNA purificado utilizando uma sequência alvo de 71 bp CAPZA3. Foram observados valores de C_q que eram menos do que a concentração mais baixa na curva padrão de qPCR para todos os tipos de amostra e estavam dentro do intervalo linear do ensaio.

Volume de sangue total	Amostra	C_q (Ciclos)
50 µl	1	27,17
	2	26,86
	3	26,95
	4	26,92
	5	27,23
	6	27,12
	7	27,21
	8	26,98
300 µl	1	26,90
	2	26,78
	3	26,84
	4	26,87
	5	26,66
	6	26,66
	7	26,84
	8	26,75

8.B. Reprodutibilidade

Tabela 5. Reprodutibilidade em utilizadores e dias. A reprodutibilidade da purificação de DNA foi determinada em diferentes utilizadores e dias, utilizando oito replicados de uma única amostra de sangue da seguinte maneira:

- O DNA purificado de três utilizadores de amostras de replicado da mesma amostra de sangue total utilizando o mesmo Maxwell® CSC Instrument no mesmo dia, com uma execução de purificação por utilizador para caracterizar a reprodutibilidade em diferentes utilizadores.
- O DNA purificado de um utilizador de amostras de replicado da mesma amostra de sangue utilizando o mesmo Maxwell® CSC Instrument, com uma execução por dia para um total de 5 dias para caracterizar a reprodutibilidade em diferentes dias.

Todas as execuções de purificação incluíram oito replicados de 300 µl de sangue total. A colheita média, rácios de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} e coeficiente de variação percentual (% CV) foram calculados dentro e entre utilizadores e dias. As colheitas e rácios de pureza de DNA extraídos utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit foram reprodutíveis em todas as variáveis testadas.

		Colheita total de DNA média (µg)		Rácio de A_{260}/A_{280}		Rácio de A_{260}/A_{230}	
	Variável	(n = 8)	% CV	médio	% CV	médio	% CV
Utilizador	1	11,18	5,7	1,93	0,2	2,00	3,4
	2	10,02	8,8	1,91	0,2	1,92	5,2
	3	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
Média de três utilizadores diferentes		11,16	10,3	1,92	0,4	1,95	4,6
Dia	1	11,88	5,3	1,93	0,4	1,93	5,1
	2	12,27	4,2	1,92	0,3	1,92	4,4
	3	12,78	6,9	1,93	0,3	1,93	3,6
	4	11,31	8,6	1,91	0,3	1,89	4,6
	5	12,92	5,5	1,93	0,3	1,92	3,0
Média de cinco dias diferentes		12,23	7,7	1,92	0,4	1,92	4,1

8.C. Substâncias interferentes (Inibição)

Tabela 6. Inibição na amplificação de DNA extraído de sangue total contendo anticoagulantes diferentes.

A inibição na amplificação de DNA foi avaliada do DNA extraído do sangue total utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit e o Maxwell® CSC Instrument. O DNA foi purificado em amostras de 300 µl de amostras de sangue total recolhido em tubos para recolha de EDTA, heparina e citrato de sódio, com oito replicados por tipo de tubo. O efeito de substâncias interferentes que possam estar presentes no DNA extraído foi caracterizado utilizando DNA de um controlo positivo exógeno disponível comercialmente. O DNA de um controlo positivo exógeno foi amplificado na presença e ausência de eluatos de DNA de cada replicado de sangue total e os resultados foram comparados para determinar se haviam fatores de inibição nos eluatos de DNA. A diferença do valor de C_q (ΔC_q) para as duas amplificações foi calculada subtraindo o valor de C_q da amplificação do DNA de controlo do valor de C_q da amplificação contendo o DNA extraído utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Um valor de ΔC_q inferior a 2 ciclos indicou que qualquer transporte de inibidores dos tubos para recolha de sangue, sangue total ou reagentes de purificação de DNA tinha um efeito limitado na amplificação. Os valores de ΔC_q médios de todos os eluatos de DNA eram de $\leq 1,87$ ciclos, demonstrando que o DNA extraído utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit não tinha quaisquer inibidores detetáveis da amplificação de DNA.

	Valores de C_q médios (Ciclos de amplificação; n = 8)	Valor de ΔC_q médio (Ciclos de amplificação; n = 8)
Sem eluato	30,49	NA
EDTA	32,36	1,87
Heparina	31,85	1,36
Citrato de sódio	32,19	1,70

8.D. Contaminação cruzada

Para avaliar se ocorreu contaminação cruzada durante a extração de DNA, amostras de sangue total masculinas e femininas foram executadas em posições alternadas na plataforma de cartucho do Maxwell® CSC Instrument. O DNA purificado foi amplificado utilizando um ensaio de qPCR de cromossoma Y específico para detetar o DNA masculino e verificar que não se encontrava presente qualquer DNA de cromossoma Y contaminante nos eluatos das amostras femininas. Qualquer resultado de concentração inferior à concentração mais baixa da curva padrão designa que não se encontrava presente qualquer DNA contaminante. Não havia qualquer contaminação cruzada detetável quando o DNA foi purificado utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit e o Maxwell® CSC Instrument.

9. Avaliação do desempenho clínico

A avaliação do desempenho clínico do Maxwell® CSC Blood DNA Kit foi realizada por um laboratório clínico externo utilizando amostras de sangue humano e o Maxwell® CSC Instrument.

9.A. Amplificabilidade do DNA

Tabela 7. Amplificabilidade do DNA extraído do sangue total utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit e o método de referência de laboratório. Para avaliar a amplificabilidade do DNA, foi purificado DNA de 16 amostras de sangue diferentes utilizando 50 µl de volume de introdução da amostra e 100 µl de volume de eluição. Foi também purificado o DNA de amostras do mesmo sangue utilizando 300 µl de volume de introdução da amostra e 50 µl de volume de eluição para abranger a gama de volumes de introdução e de eluição do Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Foi purificado DNA das mesmas amostras utilizando o método de purificação de ácido nucleico padrão de laboratório (método de referência de laboratório) para comparação. O DNA eluído foi utilizado como um modelo no teste de diagnóstico molecular do laboratório clínico para JAK2 V617F para demonstrar que o DNA extraído pode ser amplificado utilizando um ensaio de qPCR. Este teste de qPCR utiliza dois conjuntos de iniciadores, um específico para o gene de tipo selvagem e o outro específico para o V617F mutante. Como a intenção da avaliação do desempenho clínico era demonstrar que o DNA extraído utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit podia ser amplificado num teste diagnóstico com base na amplificação e não testar a sensibilidade e especificidade do ensaio diagnóstico, só foram utilizados os dados de qPCR do tipo selvagem neste estudo.

Os resultados da colheita e qPCR do DNA obtido através das mesmas amostras utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit e o método de referência de laboratório foram comparados. As amostras extraídas com o Maxwell® CSC Blood DNA Kit utilizaram a combinação do volume de introdução de sangue mais baixo (50 µl) e do volume de eluição mais elevado (100 µl) para representar a colheita mínima do Maxwell® CSC Blood DNA Kit, ao passo que o método de referência de laboratório utilizou os seus volumes padrão de introdução e de eluição de 400 µl cada. Foi determinada a concentração de DNA, medida como ng/µl, para 16 amostras de sangue separadas através da absorvância a 260 nm. O Maxwell® CSC Blood DNA Kit apresentou uma colheita de DNA semelhante para todas as amostras em comparação com o método de referência de laboratório; o rácio de colheita de DNA do Maxwell® CSC Blood DNA Kit em relação ao método de referência do laboratório era inferior a 2. Todas as amostras produziram um valor de C_q dentro do intervalo válido de 10–35.

Número de amostras testadas	Volume de introdução da amostra do Maxwell® CSC (µl)	Volume de eluição do Maxwell® CSC (µl)	Maxwell® CSC cumpre os critérios de aceitação (Valor de C_q dentro do intervalo linear)	Concordância do Maxwell® CSC com o método de referência de laboratório da colheita de DNA
16	50	100	16 de 16	16 de 16
16	300	50	16 de 16	Método de referência de laboratório não foi testado com estes volume de introdução/eluição

9.B. Reprodutibilidade

Tabela 8. Reprodutibilidade através de dispositivos de teste. Foi purificado DNA de 8 amostras de sangue total diferentes por 2 dispositivos de teste separados utilizando o Maxwell® CSC Instrument e Maxwell® CSC Blood DNA Kit. Eluatos de cada amostra foram testados em duplicado por qPCR para determinar a colheita, cumprindo o procedimento de amplificação de JAK2 V617F do laboratório clínico, utilizando os dados de tipo selvagem do ensaio para esta análise. Os resultados de colheita e qPCR de DNA obtidos das mesmas amostras por dois dispositivos de teste diferentes utilizando o sistema Maxwell® CSC foram comparados para duas combinações diferentes de volume de introdução e de eluição, utilizando 8 amostras diferentes para cada combinação. O DNA de todas as amostras obtidas através de ambos os dispositivos de teste produziram um valor de C_q dentro do intervalo válido de 10–35. A concentração do DNA, medida como ng/μl de DNA no eluato, foi determinada por absorvância a 260 nm e o rácio de colheita de DNA obtida da mesma amostra através do Dispositivo de teste 1 com a obtida pelo Dispositivo de teste 2 encontrava-se entre 0,5 e 2,0 para todas as amostras.

Número de amostras por dispositivo de teste	Volume de introdução da amostra do Maxwell® CSC (μl)	Volume de eluição do Maxwell® CSC (μl)	Valor de Ct dentro do intervalo linear do ensaio; 8 amostras por dispositivo de teste	Concordância entre o Dispositivo de teste 1 e o Dispositivo de teste 2
8	50	100	16 de 16	8 de 8
8	300	50	16 de 16	8 de 8

9.C. Contaminação cruzada

A contaminação cruzada durante a purificação do DNA no ambiente do utilizador previsto foi avaliada no caso de eluatos preparados através de sangue total utilizando o Maxwell® CSC Blood DNA Kit e o Maxwell® CSC Instrument. Amostras de sangue e controlos negativos (controlos em branco de água) foram executados em posições alternadas da plataforma de cartuchos do Maxwell® CSC. Foi purificado DNA de 8 amostras de sangue diferentes, com um volume de introdução da amostra de 300 μl e um volume de eluição de 50 μl, e 8 amostras de controlo negativo.

Os eluatos de cada amostra de controlo negativo foram testados em duplicado por qPCR cumprindo o procedimento de amplificação de JAK2 V617F do laboratório de teste. Todos os critérios de aceitação foram cumpridos. Não foi detetado nenhum DNA contaminante em qualquer um dos eluatos de controlo negativo.

10. Resolução de Problemas

Contate a filial ou o distribuidor local da Promega para obter respostas para questões não abordadas neste manual. As informações de contacto estão disponíveis em: **www.promega.com**. E-mail: **techserv@promega.com**

Sintomas	Causas e observações
Concentração mais baixa do que a esperada	O sangue que tenha sido submetido a diversos ciclos de congelamento/descongelamento pode apresentar DNA degradado. Utilize amostras que tenham sido recolhidas e armazenadas em conformidade com as condições listadas na Secção 3.
Uma amostra de sangue total de 300 µl que contém 4×10^6 a 10×10^6 de glóbulos brancos/ml deve apresentar uma colheita >80 ng/µl de DNA genómico num volume de eluição de 50 µl (conforme medido por absorvância a 260 nm).	A amostra de sangue total continha uma baixa contagem de glóbulos brancos. A colheita de DNA genómico a partir de amostras de sangue depende do número de glóbulos brancos presentes na amostra.
	Não foi adicionada solução de proteinase K, foi adicionado um volume incompleto de solução de proteinase K ou a proteinase K não foi eficazmente misturada com a amostra de sangue antes da adição do tampão de lise. A lise e a colheita dependem de uma extração completa com proteinase K. Caso a proteinase K não tenha sido adicionada na Secção 5.A, Passo 3, a amostra de sangue resultante será vermelha. As amostras tratadas com proteinase K ficam castanhas esverdeadas, o que pode ser utilizado como um indicador visual de que foi adicionada proteinase K à amostra.
	A amostra de sangue total não foi misturada antes do processamento. Certifique-se de que mistura as amostras de sangue total antes do processamento para se certificar de que os glóbulos brancos ficam em suspensão.

Sintomas

Pureza mais baixa do que a esperada

Uma amostra de sangue total de 300 µl que contém 4×10^6 a 10×10^6 de glóbulos brancos/ml eluídos num volume de 50 µl deve produzir gDNA com um rácio de A_{260}/A_{280} (pureza medida através da absorvância a 260 nm dividida pela absorvância a 280 nm) de 1,7 ou superior e um rácio de A_{260}/A_{230} (pureza medida através da absorvância a 260 nm dividida pela absorvância a 230 nm) de 1,5 ou superior.

Causas e observações

Não foi adicionada solução de proteinase K, foi adicionado um volume incompleto de solução de proteinase K ou a proteinase K não foi eficazmente misturada com a amostra de sangue antes da adição do tampão de lise. A lise e a pureza dependem de uma extração completa com proteinase K. Caso a proteinase K não tenha sido adicionada na Secção 5.A, Passo 3, a amostra de sangue resultante será vermelha. As amostras tratadas com proteinase K ficam castanhas esverdeadas, o que pode ser utilizado como um indicador visual de que foi adicionada proteinase K.

Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com o dispositivo que conduza, ou possa conduzir, a morte ou ferimentos graves de um utilizador ou paciente deverá ser comunicado imediatamente ao fabricante. Os utilizadores que se encontrem na União Europeia também deverão reportar incidentes graves à Autoridade Competente no país onde o utilizador e/ou o paciente se encontrem.

11. Bibliografia

1. Henry, J.B. (2001) *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th ed., W.B. Saunders Company, 509.

12. Produtos Relacionados

Instrumento e acessórios

Produto	Tamanho	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 de cada	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de cada	SP6019
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 de cada	AS8000
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 de cada	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 de cada	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000/pacote	V1231

*Para utilização em diagnóstico in vitro. Este produto está disponível apenas em alguns países.

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite www.promega.com para obter uma lista dos Maxwell® CSC Purification Kits disponíveis.

13. Resumo das alterações

Foram realizadas as seguintes alterações à revisão 10/22 do presente documento:

1. O título da Secção 3 foi alterado para Finalidade prevista/Utilização prevista do produto.
2. Secções 8 e 9 adicionadas e secções subsequentes renumeradas.
3. Atualizado em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 relativo a dispositivos médicos para diagnóstico in vitro.

^(a)Pat. dos EUA N.º 6.855.499 e outras patentes.

^(b)Pat. dos EUA N.º 7.329.488 e Pat. da Coreia N.º 10-0483684.

© 2012–2022 Promega Corporation. Todos os direitos reservados.

Maxwell é uma marca comercial registada da Promega Corporation.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso Web site para obter mais informações.

Todos os preços e especificações estão sujeitos a alterações sem aviso prévio.

As características dos produtos estão sujeitas a alteração. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, ou aceda ao catálogo da Promega online para obter as informações mais recentes acerca dos produtos da Promega.